

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1976 - N° 626

L'ANTIGENE "e"
TECHNIQUES DE DETECTION
HETEROGENEITE
NATURE ET SIGNIFICATION

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de LYON
Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Claude Bernard
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

le 29 Juin 1976

par

Dominique **TREPO**
né le 17 Juin 1949
à VITRY-LE-FRANÇOIS

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1975 - N° 626

L'ANTIGÈNE "e"
TECHNIQUES DE DÉTECTION
HÉTÉROGÉNÉITÉ
NATURE ET SIGNIFICATION

THESE

Pour le Doctorat de l'Université de LYON

Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

devant l'Université Claude Bernard

Unité d'Enseignement et de Recherche

des Sciences Pharmaceutiques

le 29 Juin 1976

par

Dominique TREPO

Association Amicale des Etudiants en Pharmacie de Lyon
8, avenue Rockefeller - 69008 LYON - Tél. (78) 74-40-37

à VILLY-LE-FRANÇOIS

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1976 - N° 626

L'ANTIGENE "e"
TECHNIQUES DE DETECTION
HETEROGENEITE
NATURE ET SIGNIFICATION

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de LYON

Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

devant l'Université Claude Bernard

Unité d'Enseignement et de Recherche

des Sciences Pharmaceutiques

le 29 Juin 1976

par

Dominique TREPO

né le 17 Juin 1949

à VITRY-LE-FRANÇOIS

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1975 - N° 628

L'ANTIGÈNE "e"
TECHNIQUES DE DETECTION
HÉTÉROGÉNÈTE
NATURE ET SIGNIFICATION

THÈSE



pour le Doctorat en Pharmacie
Section de Pharmacie

présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Claude Bernard
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

le 29 Juin 1975

par

Dominique TREPO
né le 17 Juin 1949
à VITRY-LE-FRANÇOIS

UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD

PRESIDENT : M. le Professeur D. GERMAIN

PREMIER VICE-PRESIDENT : M. le Professeur ELBAZ

DEUXIEME VICE-PRESIDENT : M. P. PONCET, Maître-Assistant

TROISIEME VICE-PRESIDENT : M. C. BADOR, Etudiant

SECRETAIRE GENERAL DE L'UNIVERSITE : M. J. RAMBAUD

Administrateur Civil.

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE (U.E.R.)

U.E.R. Médicale GRANGE-BLANCHE : M. le Docteur B. SALLE, Maître de Conférences
Agrégé

U.E.R. Médicale ALEXIS-CARREL : Monsieur le Professeur C. GIROD

U.E.R. Médicale LYON-NORD : M. le Professeur J.P. GARIN

U.E.R. Médicale SUD-OUEST : M. le Professeur J. ROBERT

U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques : M. le Professeur L. ODDOUX

U.E.R. des Techniques de Réadaptation : M. A. MORGON, Maître de Conférences
Agrégé

U.E.R. de Biologie Humaine : M. le Professeur J.C. CZYBA

U.E.R. d'Education Physique et Sportive : M. A. MILLON Professeur d'E.P.S.

U.E.R. des Sciences Odontologiques : M. le Docteur R. VINCENT

U.E.R. de Mathématiques : M. le Professeur G. MAURY

U.E.R. de Physique : M. le Professeur R. UZAN

U.E.R. de Chimie et Biochimie : M. le Professeur J. HUET

U.E.R. des Sciences de la Nature : M. le Professeur J. BRUN

U.E.R. de Sciences Physiologiques : M. R. FONTANGES, Maître de Conférences
Agrégé

U.E.R. de Physique Nucléaire : M. le Professeur A. SARAZIN

U.E.R. de Mécanique : M. le Professeur J. MATHIEU

I.U.T. 1 : M. le Professeur B. POUYET

I.U.T. 2 : M. J. GALLET, Directeur E.N.S.A.M.

Observatoire de LYON : M. le Professeur J.H. BIGAY

Examineurs de la Thèse :

Président : Monsieur le Professeur R. MALLEIN

Assesseurs : Monsieur le Professeur A. BADINAND
Monsieur le Professeur M. SEPETJIAN
Monsieur le Professeur J.C. MONIER

A MA FEMME FREDERIQUE

A MES PARENTS

A MES FRERES,

*en particulier à CHRISTIAN qui a été à l'origine de
ce travail et qui m'a conseillé tout au long
de sa réalisation*

A MA SOEUR

A MES BEAUX-PARENTS

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur R. MALLEIN

C'est lui qui a guidé nos tout premiers pas hospitaliers, puisqu'il a bien voulu nous accueillir dans son service en tant qu'externe. Il a su, par son exemple, susciter en nous une vocation biologique et permettre sa réalisation dans le cadre de l'internat en pharmacie.

Nous tenons à lui exprimer par ce travail notre profonde gratitude et notre fidèle attachement.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur A. BADINAND

Nous avons effectué la majeure partie de notre internat au sein de la vaste équipe qu'il anime. C'est donc grâce à lui, à sa sagesse et à ses conseils avisés que nous avons pu parfaire notre formation professionnelle. Il nous fait un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

Qu'il soit assuré de notre respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur M. SEPETJIAN

Il nous a accueilli chaleureusement dans son laboratoire où nous avons pu disposer des moyens de réaliser ce travail. Son dynamisme et l'efficacité qu'il sait inculquer quotidiennement à toute son équipe, retiennent notre admiration.

Nous le remercions de son aide indispensable et de la confiance qu'il a su nous manifester.

Monsieur le Professeur J.C. MONIER

Par l'enseignement qu'il nous a prodigué, il a su nous passionner pour l'immunologie.

Sa grande expérience et ses conseils dans cette discipline nous ont été extrêmement précieux.

Qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde estime.

Nous tenons à remercier tout particulièrement :

Messieurs Olivier HANS et Georges NEMOZ

Unité INSERM 45
Laboratoire de Physio-pathologie digestive,
pour leur collaboration sans laquelle certaines expériences
auraient été irréalisables.

Madame le Docteur Nelly BLANC

Unité INSERM 80
Laboratoire d'Anatomo-Pathologie,
qui a eu la gentillesse de nous consacrer de nombreuses
après-midi, rendant ainsi possible l'étude de l'Ag "e"
en microscopie électronique.

Madame Marie-France JACQUIER

Unité INSERM 51
Unité de Virologie,
pour sa compétence dans la préparation des grilles de
microscopie électronique et son expérience dans
l'identification des particules virales.

Enfin, tous nos Collaborateurs du Laboratoire d'Hygiène et plus spécialement :

Philippe	CHEVALLIER
----------	------------

Yvette	SALAS
--------	-------

Ghislaine	LEFEVRE
-----------	---------

Nicole	CORVEE
--------	--------

Dominique	BOYER
-----------	-------

P L A N

=====

I - RAPPELS SUR LE VIRUS DE L'HEPATITE B ET SES ANTIGENES 1

- =====
- A - L'Ag HBs
 - 1°) Historique
 - 2°) Nature
 - 3°) Ultrastructure
 - 4°) Techniques de détection
 - 5°) Les sous-types.
 - B - L'Ag HBc
 - 1°) Mise en évidence
 - 2°) Conception actuelle du virus HB
 - 3°) Recherche de l'Ag HBc et des Ac anti HBc
 - C - L'Ag-e
 - 1°) Découverte
 - 2°) Signification clinique et pronostique
 - 3°) Hétérogénéité de l'Ag-e

II - DETECTION DE L'Ag-e ET DE L'ANTI-e PAR I D et E I D 11

- =====
- A - Technique d'I D
 - B - Préparation de l'anti-e
 - C - Préparation de l'Ag-e
 - α) Précipitation au P E G
 - 1°) Principe
 - 2°) Méthodologie
 - 3°) Etude des paramètres de la précipitation par le P E G 6000
 - β) Aérosil
 - γ) Chromatographie d'affinité
 - D - Recherche des paramètres optima pour l'E I D
 - 1°) Le milieu gélifié
 - 2°) Le tampon
 - 3°) Taille et écartement des puits
 - 4°) Voltage intensité durée de migration
 - 5°) Lecture coloration.
 - E - Différents protocoles utilisables pour l'E I D
 - 1°) Protocole de base
 - a) réactifs
 - b) technique

- 2°) Modification de la durée de migration
- 3°) Utilisation d'un tampon borate.

III - RESULTATS 28

=====

- 1°) Comparaison ID et CEP pour la détection de l'Ag-e et de l'anti-e
- 2°) Fréquence de l'Ag-e et de l'anti-e en fonction des différentes pathologies associées au virus HB
- 3°) Fréquence de l'Ag-e et de l'anti-e chez les porteurs chroniques d'Ag HBs : hémodialysés ou donneurs de sang.
- 4°) Discussion
 - a) Intérêt de l'E I D
 - b) Fréquence et valeur pronostique de l'Ag-e et de l'anticorps anti-e

IV - AUTRES TECHNIQUES DE DETECTION DE L'Ag-e et de l'Ac anti-e . . . 34

=====

A - La rhéophorèse

B - Immunofluorescence

C - Immunoélectrophorèse

V - ETUDE DES SPECIFICITES e_1 et e_2 38

=====

- 1°) Mobilité électrophorétique
- 2°) Affinité pour les colorants
- 3°) Présence de e_1 et/ou e_2 et des Ac anti- e_1 et anti- e_2 en fonction de la pathologie
- 4°) Inactivation par la chaleur.

VI - IMMUNOELECTROMICROSCOPIE 43

=====

- 1°) Introduction
- 2°) Résultats antérieurs
- 3°) Matériel et techniques utilisés
- 4°) Résultats interprétation.

VII - CONCLUSIONS 47

=====

BIBLIOGRAPHIE 49

=====

I - RAPPELS SUR LE VIRUS DE L'HEPATITE B ET SES ANTIGENES.

=====

A - L'Ag HB_S

1°) Historique

BLUMBERG au cours d'investigations systématiques à la recherche d'isoprécipitines contre les allotypes des lipoprotéines du sérum humain par immunodiffusion, mit en évidence des arcs de précipitation entre le sérum de deux hémophiles polytransfusés et le sérum d'un aborigène australien. C'est pourquoi ce nouvel antigène ainsi mis en évidence fut baptisé Australia (Ag Au).

L'Antigène Australia est exceptionnellement présent dans la population saine, mais les polytransfusés possèdent fréquemment des anticorps anti-australia. Ce nouvel Ag est différent des β -lipoprotéines car il présente en immunodiffusion une réaction de non-identité avec celles-ci. De plus, ses propriétés tinctoriales immuno-électrophorétiques et moléculaires sont différentes.

C'est une lipoprotéine de poids moléculaire supérieur à 3 000 000 qui a la mobilité électrophorétique d'une α globuline.

Lors de la recherche systématique de l'Antigène Australia, une fréquence élevée fut observée chez les malades atteints de leucémie aiguë. L'auteur pensa alors avoir identifié un marqueur de l'agent causal de la leucémie. Cependant, une prévalence accrue d'Ag Au fut également notée chez 28 % des mongoliens vivant dans de grandes institutions, dans la lèpre sous sa forme lépromateuse, au cours des thalassémies et surtout au cours de 20 % des hépatites virales. Une corrélation entre Ag Au et hépatite virale est alors soupçonnée pour la première fois.

Parallèlement en 1967, OKOCHI à Tokyo, étudie les conséquences de la transfusion de sang contenant l'Ag Au. Les sujets recevant une transfusion de sang Au positif présentent fréquemment une hépatite clinique et / ou développent une antigénémie Au transitoire. Quant à ceux qui ne présentent pas d'hépatite développent le plus souvent une réponse anticorps anti Au de type anamnétique.

Par ailleurs, PRINCE décrit en 1968, un nouvel Ag sérique détecté lors de la période d'incubation de l'hépatite transfusionnelle et le nomme Ag SH (Sérum Hepatitis) car cet Ag lui paraît spécifique de l'hépatite sérique.

Indépendamment, BLUMBERG note chez certains sujets Au + (leucémiques, mongoliens, etc...), une augmentation des transaminases SGPT confirmant la relation entre hépatite virale et Ag Au.

L'identité entre les antigènes Au et SH étant bientôt établie, restait à préciser la spécificité de l'Ag Au vis à vis de l'hépatite A ou B. Alors que PRINCE ne le retrouve que dans l'hépatite B, BLUMBERG le retrouve dans les 2 types d'hépatite :

dans 41 % des cas pour l'hépatite B

dans 22 % des cas pour l'hépatite A.

De cette discordance de vues, découlera la pluralité des dénominations de l'Ag Au. Au terme d'Ag SH vient s'ajouter celui d'HAA (Hépatites Associated Antigen) et Ag HB (Ag de l'hépatite B). La spécificité de l'Ag Au vis à vis de l'hépatite B sera confirmée grâce aux travaux de KRUGMAN et GILES à l'école de WILLOW BROOK aux U.S.A. (11). Ces auteurs avaient apporté en 1967 la preuve de l'existence de deux types d'hépatites virales distinctes sur le plan clinique, épidémiologique et immunologique.

Grâce à des expériences d'inoculations successives chez des enfants encéphalopathes, deux types de virus ont pu être distingués :

3°) Ultrastructure

BAYER, BLUMBERG et WERNER , les premiers appliquèrent la microscopie électronique à l'étude l'Ag HB et décrivent des particules sphériques de 20 nm de diamètre ainsi que des bâtonnets de 50 à 230 nm de long et de même diamètre.

Un 3ème type de particules fut décrit par DANE qui observa en plus des petites sphères et des bâtonnets, des particules en cocarde de 42 nm qui ressemblent à des virus (formes suggérant une symétrie icosaédrique).

Ces 3 types de particules sont agrégées après addition d'anticorps anti HB ce qui confirme l'existence d'Ag HB à leur surface.

4°) Techniques de détection

Depuis l'immunodiffusion selon la technique d'OUCHTERLONY qui permit à BLUMBERG de mettre en évidence l'Ag HBs, les techniques ont évolué pour atteindre une sensibilité sans cesse croissante. On peut classer ces techniques en 3 générations selon leur niveau de sensibilité.

1ère génération :

L'immunodiffusion (ID) :

Décrite par OUCHTERLONY, c'est une méthode simple, et très spécifique mais peu sensible et longue (2 jours). Par l'étude des communautés antigéniques, on peut affirmer l'identité totale ou partielle d'un nouvel antigène vis-à-vis d'un Ag de référence. C'est la méthode de choix pour l'étude des déterminants antigéniques.

2ème génération

a) L'électro-immunodiffusion (EID)

Afin d'accroître la sensibilité et la rapidité de la précipitation en milieu gélifié, on a fait migrer l'antigène et l'anticorps l'un vers l'autre sous l'influence d'un champ électrique : c'est l'électro-immunodiffusion (EID) ou électro-synérèse ou contre-électrophorèse (CEP) .

En milieu agarose à pH 8,6 l'Ag migre à l'anode comme une α -2-globuline et l'anticorps anti HBs sous l'action du flux d'électro-endosmose migre à la cathode. On obtient ainsi, en 60 à 90' selon les conditions opératoires, un arc de précipitation. On pratique systématiquement une deuxième lecture à 24 h. Cette technique est 4 à 10 fois plus sensible que l'immunodiffusion, plus rapide et se prête bien à la réalisation de grandes séries.

b) Fixation du complément.

Technique sérologique classique, elle fut adaptée à l'Ag HBs et se révéla supérieure à l'EID pour la détection de l'antigène, mais décevante pour la recherche de l'anticorps.

c) L'immuno-adhérence hémagglutination (IAH)

Le principe de cette technique est fondé sur la propriété des complexes antigène-anticorps ayant fixé le complément d'agglutiner des hématies d'origine humaine. La sensibilité serait supérieure à la fixation du complément.

d) Aggrégation des plaquettes

Cette technique est très peu utilisée.

e) Hémagglutination passive - Inhibition (HA - IHA)

L'hémagglutination passive décrite par VYAS et SCHULMAN est la méthode de choix pour détecter l'anticorps pour lequel elle atteint la sensibilité des techniques radio-immunologiques. L'inhibition de l'hémagglutination permet de détecter l'antigène. Cette technique se prête à l'automatisation.

f) Hémagglutination des particules de latex.

L'hémagglutination des particules de latex recouvertes d'Ac, technique fort satisfaisante pour d'autres systèmes Ag Ac, s'est révélée décevante pour l'Ag HBs. D'une sensibilité un peu supérieure à l'EID, elle

n'était pas suffisamment spécifique, mais présentait l'avantage d'une manipulation simple et rapide.

3ème génération

a) Dosage radio-immunologique (DRI)

Le dosage radio-immunologique par double dilution isotopique a été appliqué à l'Ag HBs par WALSH, YALOW et BERSON. Cette technique est très sensible pour la détection de l'antigène comme de l'anticorps, mais elle est longue (2 à 3 jours) et délicate.

Une technique en phase solide a été mise au point par LING et OBERBY. Dans cette technique, l'antigène est fixé sur un anticorps froid puis révélé par un anticorps marqué. La méthode est d'une réalisation simple, rapide (3 à 4 h) et elle offre une grande sensibilité. Par contre, elle n'est que semi-quantitative. Les problèmes de spécificité dus à l'utilisation de deux anticorps animaux de même espèce semblent avoir été amendés par l'utilisation d'un anticorps anti HBs marqué d'origine humaine.

b) Hémagglutination passive inverse (RPHA)

(ou "Reverse Passive Hemagglutination").

Si l'HA (Ag fixé sur hématies) a été adaptée assez rapidement à l'Ag HBs ce n'est que depuis peu que l'on a réussi à coupler de l'Ac anti HBs sur des hématies. Cette technique affranchie des contraintes de la radio-immunologie offre cependant une sensibilité voisine tout en restant quantitative.

La spécificité peut être obtenue en vérifiant tout résultat positif par neutralisation. Si les niveaux de sensibilité de ces techniques sont différents, la difficulté et la durée de leur réalisation le sont également.

L'immunofluorescence.

L'immunofluorescence n'est pas une technique utilisée pour la détection de l'Ag HBs dans le sérum. Elle a permis, par l'utilisation

d'Ac anti HBs et anti HBc fluorescents, de préciser que l'Ag AU (Ag HBs) était localisé dans le cytoplasme des hépatocytes alors que l'Ag HBc se trouvait dans le noyau des hépatocytes infectés par le virus B.

5°) Les sous-types de l'Ag HBs.

Lors des premières études en immunodiffusion, BLUMBERG et LEVENE avaient remarqué la présence d'éperons entre les lignes de précipitation et avaient suggéré l'hétérogénéité de l'Ag HBs et l'existence de multiples déterminants antigéniques. Indépendamment les uns des autres, LE BOUVIER (13) d'une part, TILLES et KIM (31) d'autre part, ont décrit trois déterminants principaux, l'un commun à tous les Ag HBs : "a" et 2 autres mutuellement exclusifs "d" et "y" ce qui permettait deux types antigéniques "ad" et "ay".

Deux autres déterminants "w" et "r" également exclusifs furent décrits par BANCROFT.

Depuis il a été décrit de nombreux autres déterminants x, n, t, q et des subdivisions de a : a_1 , a_2 et a_3 et il semble que le nombre des sous-types possible soit très élevé.

L'étude de ces sous-types n'a pas permis de rattacher un sous-type donné à une forme clinique particulière d'hépatite mais a permis de dresser une carte de la répartition géographique des principaux sous-types. Plus leur nombre croît, plus ces sous-types doivent être considérés comme un outil de travail intéressant en épidémiologie mais dénué de toutes propriétés biologiques particulières.

B - L'Ag HBc

1°) Mise en évidence

ALMEIDA et coll. (1) observent après traitement par le Tween 80

que les particules de DANE se séparent en une enveloppe externe portant la spécificité antigène Au et en un noyau sphérique de 27 nm de diamètre ressemblant à un reovirus et possédant une spécificité antigénique différente.

En effet, un sérum prélevé chez un sujet convalescent d'une hépatite B possède des anticorps spécifiques de cet antigène interne alors qu'il ne possède pas d'anticorps anti HB. Ce nouvel Ag d'après la nomenclature de l'OMS est appelé Ag HBc (Core Antigène) et les anticorps correspondants anticorps anti HBc. Cet antigène serait lié à la nucleocapside du virion. Nous l'appellerons Ag Nucleocapsidique.

Quant à l'Ag HB qui représente un antigène d'enveloppe, il devient l'Ag HBs (Ag de surface du virus HB).

2°) Conception actuelle du virus HB

On pense que la particule de DANE représenterait le virus complet sous sa forme circulante comprenant une enveloppe lipoprotéique ayant la spécificité antigénique Ag HBs et un nucléoïde central contenant des acides desoxyribonucléiques et ayant la spécificité Ag HBc.

Le virus HB aurait une structure icosaédrique, la capsid^oe étant formée de sous unités de 30 Å et serait ainsi proche des réovirus. Les formes sphériques ou tubulaires ne seraient que des virions immatures ou incomplets (procapsides, capsides vides) réarrangés et éliminés des sites de replication. Cette élimination est quantitativement importante vu les valeurs élevées de certaines antigénémies HBs et témoignerait d'un déséquilibre au niveau de la replication virale. Un phénomène analogue se produit pour les virus de certaines plantes qui, en fonction des conditions du milieu, se présentent sous des formes plus ou moins complètes.

3°) Recherche de l'Ag HBc et des anticorps anti HBc.

L'Ag HBc a pu être localisé dans le noyau des hépatocytes par des techniques d'immunofluorescence par contre jusqu'à présent, l'Ag HBc n'a pu être mis en évidence à l'état libre dans la circulation. Seul l'Ac anti HBc est détectable dans le sérum.

L'Ac anti HBc est presque toujours détecté quand l'Ag HBs est présent et il semble un meilleur témoin de la replication virale que l'Ag HBs. En effet, l'Ag HBs peut éventuellement ne pas être détecté dans le sérum alors que la recherche d'anti HBc est positive témoignant de la présence du virus dans le foie des malades (38).

Ces anticorps anti HBc peuvent être recherchés par fixation du complément, électro-immunodiffusion, dosage radioimmunologique en phase liquide ou radioimmunoprécipitation.

C - L'Ag e

1°) Découverte.

En 1971, MAGNIUS et ESPMARK (15) à Stockolm remarquent plusieurs lignes de précipitation antigéniquement distinctes entre les sérums de certains sujets Ag HBs positifs. Ils baptisent ce nouvel antigène "e".

Des recherches ultérieures révèlent que l'Ag e diffère des autres déterminants antigéniques connus de l'Ag HBs (différents sous-types) tant par ses propriétés immunologiques que physicochimiques : taille, ultracentrifugation en gradient de densité (16). Il est également différent de l'Ag HBc. On est donc en présence d'un 3ème système Ag - Ac associé au virus HB.

2°) Signification clinique et pronostique.

Plusieurs études ont suggéré que la persistance de l'Ag e dans le sérum a une signification pronostique chez les sujets porteurs de l'Ag HBs. En effet, NIELSEN (20) détecte l'Ag e avec une fréquence significativement plus élevée dans les hépatites chroniques (58 %) et les cirrhoses (31 %) que dans les hépatites aiguës (10 %). D'autre part, sa présence dans les hépatites aiguës est en faveur d'un pronostic de passage à la chronicité.

D'autre part, MAGNIUS (17) détecte l'Ag e avec une fréquence plus grande chez les porteurs de l'Ag HBs avec un tableau histologique d'hépatite chronique agressive ou persistante. Par contre, chez les sujets possédant

des anticorps anti e, l'atteinte hépatique est nulle ou faible.

D'autres observations ont permis d'associer l'Ag e à l'infectiosité d'un sujet porteur de l'Ag HBs (fréquence de l'Ag e chez les hémodialysés chroniques considérés comme des sujets particulièrement infectieux). (9 - 15-17)

La présence de l'Ag e dans les atteintes hépatiques chroniques a été confirmée ultérieurement par d'autres auteurs (6). Cependant, ces corrélations ne sont pas absolues (4 - 5 - 30).

3°) Hétérogénéité de l'Ag e

Dès la première étude sur l'antigène e, MAGNIUS et ESPMARK avaient défini cet antigène comme une famille complexe de protéines sériques hétérogènes. En effet, sur les plaques d'immunodiffusion, on pouvait observer au moins deux lignes de précipitation.

LE BOUVIER étudiant ces déterminants de l'Ag e les a nommés provisoirement e1 et e2. Leur nature et leur répartition sont actuellement à l'étude.

II - DETECTION DE L'Ag e ET DE L'ANTI e PAR I D

=====

A - Technique d'ID

Lors de la mise en évidence du système e - anti e, MAGNIUS utilisait l'immunodiffusion ID et c'est avec cette technique (15) qu'il a réalisé ses travaux ultérieurs. Il s'agit d'une double immunodiffusion selon OUCHTERLONY, avec une disposition hexagonale des 6 puits périphériques autour d'un puit central. Le gel est une agarose purifiée à 0,9 % (Indubiose A 37 de l'Industrie Biologique Française), dissout dans un tampon pH 8,6 :

0,01 M TRIS

0,1 M NaCl

0,1 % de sulfate de Protamine

2 % Sulfate de Dextran T 250 (PHARMACIA)

0,001 M Azide de Sodium.

L'Azide de Sodium est utilisé comme agent conservateur afin d'éviter la contamination bactérienne de l'agarose. Les plaques sont placées en chambre humide après le remplissage des puits par les différents réactifs. Une première lecture peut être faite après 12 à 24 h et les plaques devront être relues après 3 à 4 jours. Cette technique est de réalisation simple mais de sensibilité faible et nécessite donc d'utiliser des réactifs purifiés et concentrés.

B - Préparation de l'anti-e

Si certains sérums étaient suffisamment riches en anti-e pour servir de réactif sans autre traitement, le plus souvent il est nécessaire d'enrichir ces sérums en anticorps anti-e.

Il s'agit donc d'obtenir une fraction γ globuline purifiée en éliminant au maximum les autres protéines sériques.

A cet effet, nous avons utilisé une technique de précipitation des γ globulines par le sulfate d'ammonium.

Réactifs :

1. Solution saturée de Sulfate d'Ammonium
2. Tampon PBS pH 7,4 0,1 M

Technique :

Tous les réactifs et le sérum ont été placés à + 4° C et les différentes manipulations (y compris les centrifugations) ont lieu à + 4° C afin d'éviter la dénaturation des γ globulines.

1°) Le sérum est clarifié par centrifugation 10 minutes à 5 000 tours/minute.

2°) On ajoute au sérum le sulfate d'ammonium saturé jusqu'à obtention d'une concentration finale de 40 %. Cette addition est faite progressivement et sous agitation magnétique constante.

3°) Centrifuger 20 minutes à 12 000 tours par minute. Eliminer le surnageant. Reprendre le culot par du PBS jusqu'à obtention d'un volume égal au volume de départ.

4°) Procéder à une nouvelle précipitation par le sulfate d'ammonium à 40 %.

5°) Reprendre par du PBS et mettre à dialyser en boudin de dialyse contre du PBS pH 7,4 jusqu'à élimination totale du sulfate d'ammonium.

6°) Concentrer sur cellule d'ultrafiltration AMICON avec des membranes XM 100 jusqu'à un volume final égal au 1/5ème du volume de sérum de départ.

7°) Répartir sous petits volumes (0,5 ml) et congeler.

D'autres techniques classiques sont utilisables : technique de COHN, précipitation au Rivanol. On peut également utiliser la précipitation par le Polyéthylène Glycol (P E G), technique que nous avons préféré réserver pour la préparation d'un réactif Ag e.

C - Préparation de l'Ag e

α) Précipitation au P E G

1°) Principe

Dans ce cas, le matériel de départ sera du sérum humain contenant de l'Ag e et que l'on va devoir concentrer. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique à la P E G décrite par MAGNIUS (16).

Cette méthode utilise la propriété des polymères linéaires de haut poids moléculaire (tels P E G, Dextran, polyvinyl alcool et polyvinyl pyrrolidone) de fractionner les mélanges de protéines. Parmi ces substances le P E G semble particulièrement intéressant car c'est celui qui donne les solutions les moins visqueuses et il dénature très peu les protéines à température ambiante (26).

La concentration optima de P E G choisie par MAGNIUS est de 13 %.

2°) Méthodologie

Réactifs :

1. Phosphate disodique 0,02 M ajusté à pH 7 par de l'acide citrique
2. Acétate de sodium 0,025 M pH 5,8
3. P E G 6000 à 39 % (P/V) dans Phosphate disodique 0,02 M.

Technique

- 1°) Clarifier le sérum par centrifugation 10 minutes à 5 000 tours par minute.
- 2°) Ajouter à 2 volumes de sérum un volume de P E G à 39 %
- 3°) Laisser sédimenter une nuit à + 4° C.
- 4°) Centrifuger 10 minutes à 3000 tours/minute.
- 5°) Eliminer le surnageant.
- 6°) Reprendre le précipité par du tampon acétate de sodium 0,025 M pH 5,8 jusqu'à un volume égal au 1/5ème du volume initial de sérum.

On obtient ainsi un réactif concentré 5 fois et partiellement purifié. En effet, toutes les protéines de faible poids moléculaire n'ont pas été précipitées par le P E G à 13 % (à cette concentration, les immunoglobulines sont précipitées).

L'inconvénient majeur de cette technique est la viscosité du réactif ainsi obtenu due à la présence de P E G. Il est impossible d'éliminer le P E G par simple dialyse. On peut s'en débarrasser par chromatographie d'échange d'ions sur D E A E Cellulose (26). Le P E G n'est pas fixé et peut être éliminé par lavage de la colonne avant d'éluer les protéines fixées par un tampon approprié. Une autre technique utilisable est la précipitation des protéines par l'alcool (26). Le P E G étant très soluble dans l'alcool sera facilement éliminé avec le surnageant alcoolique. Cette seconde technique permet de plus de concentrer les protéines ainsi purifiées.

3°) Etude des paramètres de la précipitation par le P E G 6000

Nous avons étudié l'influence de la concentration de P E G et du type de tampon. Pour ce faire, un plasma contenant de l'Ag e a été fractionné suivant la technique de POLSON (26) en utilisant des concentrations croissantes de P E G.

D'autre part, deux types de tampon ont été utilisés :

- un tampon phosphate de sodium 0,02 M pH 7
- un tampon acétate de sodium 0,02 M pH 4,6

Le fractionnement par le P E G étant plus sélectif sur un plasma dilué, nous avons dilué le plasma au 1/5ème. Afin d'éliminer l'Albumine et autres protéines de faible poids moléculaire, le plasma a subi une précipitation préalable à pH 7 par le P E G à 14 % et le surnageant éliminé.

Pour chaque précipité obtenu, nous avons mesuré son volume, sa concentration en protéines (Méthode au biuret de GORNALL) et son titre en Ag-e par E I D. Les résultats sont colligés dans le tableau qui suit.

Fractionnement par P E G 6000 à pH 7

Concentration en PEG	Plasma de départ	0-5 %	5-7 %	7-9 %	9-11 %	11-13 %	Surnageant
Volume ml	10	5	2	2	2	2	65
Protéines mg/ml	54	10	5	22	10	8	2
Titre d'Ag-e par E I D	16	4	16	2	1	2	1
Ag HBs par E I D	+	+	+	+	+	+	0

Fractionnement par P E G 6 000 à pH 4,6

Concentration en PEG	Plasma de départ	0-4 %	4-9 %	9-12 %	12-14 %	14-16 %	Surna- geant
Volume (ml)	10	5	5	3	3	3	40
Protéines mg/ml	54	10	10	13	9	6	1
Titre d'Ag-e par E I D	16	2	4	1	0	0	1
Recherche de l'Ag HBs par E I D	+	+	0	0	0	0	0

Les calculs approchés de rendement (on ne connaît pas les concentrations mais les titres), ont montré que en partant d'un sérum dilué, on ne récupérerait que 30 à 60 % de l'activité Ag-e contenue dans le plasma de départ. Si l'on précipite avec la P E G à 13 % un plasma non dilué, le rendement est alors de 90 %.

Cette perte s'explique par le fait que le surnageant de la précipitation à 16 % de P E G contient encore de l'Ag-e. Cependant, si l'on veut éliminer les petites protéines on ne peut dépasser cette concentration de 16 %. Il est à noter que si à pH 7 les fractions contenant de l'Ag-e contiennent toutes de l'Ag HBs à pH 4,6, la fraction 4-9 % et les suivantes ne contiennent plus d'Ag HBs. Il semblerait donc qu'une partie au moins de l'Ag-e puisse ne pas être liée à l'Ag HBs.

Si l'utilisation d'un plasma dilué au départ fait perdre une partie de l'Ag-e, elle offre l'avantage d'obtenir un réactif mieux purifié. La précipitation par le P E G est en effet sous cette forme plus sélective.

β) Aérosil

Utilisant la propriété de l'acide silicique (Aérosil) d'adsorber les lipoprotéines, une technique de séparation de l'Ag HBs a été décrite par HEDLUND (10).

Nous avons tenté à l'aide de cette méthode, de séparer l'Ag HBs de l'Ag-e. Il a été possible de vérifier qu'après incubation d'un sérum Ag HBs positif avec de l'Aérosil, le surnageant était dépourvu d'Ag HBs recherché par dosage radio immunologique (31).

Cependant, dans ce surnageant, après concentration 10 fois, l'Ag-e n'a pu être retrouvé par E I D. La plupart si ce n'est la totalité de l'Ag-e semble donc être soit liée à l'Ag HBs, soit adsorbée par l'acide silicique. Cette technique semble ne pouvoir être appliquée à la préparation d'Ag-e, mais reste un moyen commode d'éliminer l'Ag HBs d'une préparation.

γ) Chromatographie d'affinité

Avec l'ultracentrifugation, la chromatographie d'affinité s'est révélée être la méthode de choix pour la préparation d'Ag HBs purifié (28) Nous avons donc essayé de l'appliquer à la purification d'Ag-e.

Dans un premier temps, un sérum ayant un titre élevé en anti-e (1/16e en E I D) a été purifié par le sulfate d'ammonium. Puis afin de réaliser un immuno adsorbant, cette fraction γ globuline (titre 1/64ème) a été couplée à du sépharose 4 B.

A travers la colonne ainsi préparée, nous avons fait passer un sérum ayant un titre d'Ag-e au 1/16ème. Afin de favoriser la fixation de l'Ag-e sur la colonne, celle-ci a été placée 2 heures à 37° C avant rinçage par du tampon TRIS 0,01 M NaCl 0,14 M pH 7,2.

Enfin pour éluer l'Ag-e fixé, les liaisons Ag - Ac ont été rompues par l'emploi d'un tampon à pH élevé : bicarbonate 0,2 M NaCl 0,5 M pH 11. La mesure à 280 nm de la densité optique sur les fractions collectées à la sortie de la colonne, n'a révélé qu'une très faible

teneur en protéines répartie sur un grand nombre de tubes. Après dialyse contre du P B S 0,1 M pH 7,4 et concentration 20 fois sur cellule AMICON, aucune activité Ag-e n'a pu être retrouvée en E I D. Ces protéines éluées ne seraient donc que des contaminants.

Pourtant, nous avons vérifié que l'Ag-e n'était pas dénaturé par le tampon d'élution Bicarbonate pH 11. D'autre part, une incubation de 3 h à 37° ne supprime pas l'activité Ag-e d'un sérum.

Il faudrait donc admettre que l'Ag-e fixé sur la colonne n'est pas élué à pH 11 ce qui paraît peu probable étant donné la faiblesse apparente de l'affinité du système Ag-e Ac-e (en E I D les arcs de précipitation ne sont visibles qu'après une nuit d'incubation à 28°C).

Il paraît plus vraisemblable que l'immunosorbant étant réalisé avec un anticorps non purifié, la fixation de l'Ag-e soit faible et que l'E I D ne suffise pas à détecter le peu d'Ag-e élué par la suite.

Devant l'échec de ces deux techniques de purification de l'Ag-e, la purification par le P E G 6000 reste la méthode que nous utilisons pour préparer un réactif Ag-e.

B - Recherche des paramètres optima pour l'E I D

Nous rappellerons brièvement le principe de l'électro immunodiffusion E I D encore appelée de façon plus parlante contre électrophorèse (C E P) ou électrosynérèse.

En milieu tamponné à pH 8,6 les protéines sériques douées de propriétés amphotères sont chargées négativement et vont migrer à l'anode. D'autre part, au cours de toute électrophorèse (excepté en veine liquide), il existe une migration de certains ions du tampon vers la cathode. Ce phénomène est appelé flux d'électroendosmose. Il est dû en partie au fait que le gel présente un certain nombre de radicaux chargés négativement (groupements sulfates). Il a été montré que l'électroendosmose est fonction du degré de pureté de l'Agar utilisé. L'électroendosmose est minimum, quoique relativement importante, avec l'agarose (qualité d'agar très pure) et déjà plus importante avec l'Agar Noble DIFCO (36) De même le vieillissement du gel une fois coulé faisant apparaître des charges fixes supplémentaires augmente l'électroendosmose (36).

C'est donc ce flux d'électroendosmose dirigé vers la cathode qui permet aux γ globulines (fraction de mobilité la plus faible) de migrer à la cathode et rend ainsi possible la contre électrophorèse.

Nous allons maintenant passer en revue les principaux paramètres de l'électroimmunodiffusion en précisant les raisons de notre choix.

1°) Le milieu gélifié

Si l'électroendosmose est nécessaire à la réalisation d'une E I D, elle doit être minimum afin d'obtenir la sensibilité maximum (36). C'est pourquoi nous utilisons l'agarose.

Nous avons utilisé des mélanges de différentes concentrations d'Agarose et d'Agar Noble qui augmentant l'électroendosmose devait permettre d'éloigner les arcs de précipitation du puit Ac. Différents gels d'agarose contenant 10 % , 20 % et 50 % d'Agar Noble furent préparés. Le déplacement des lignes de précipitation vers la cathode était sensible avec 20 % d'Agar

Noble. Cependant, les arcs étaient flous et peu intenses. Aussi la perte de sensibilité et la difficulté de lecture nous a incité à n'utiliser que de l'agarose et en particulier l'Indubiose A 37 comme l'ont préconisé certains auteurs (8).

Une autre variable de ce milieu gélifié est sa concentration. Elle intervient par l'effet de ralentissement, voire même de tamis que jouent les mailles du gel sur la migration des protéines et particules. Les gels utilisés en E I D varient de 0,8 à 2 %. Cependant la consistance du gel à température ordinaire est fonction de sa teneur en agarose et à 1 % et en dessous le gel devient très fragile. C'est pourquoi nous avons utilisé une concentration de 1,5 %.

2°) Le tampon

Le tampon intervient par sa force ionique et son pH. Sa force ionique détermine ses propriétés de conductibilité électrique. Nous avons utilisé des tampons de force ionique $\mu = 0,05$. Par exemple, avec un tampon Veronal acide, Veronal sodique, on utilise une molarité comprise entre 0,032 M et 0,050 M

Afin de diminuer l'échauffement dans les bacs et surtout dans le gel (créant des mouvements de convection qui perturbent la migration électrophorétique), on peut diminuer la molarité du tampon. L'intensité du courant étant plus faible, il faudra alors augmenter la durée de migration.

Le pH du tampon ne doit pas dénaturer les protéines présentes et doit être favorable à la précipitation des complexes Ag-Ac formés. Les pH très alcalins dénaturent rapidement les γ globulines et en pH acide (inférieur à pH 4) la formation des arcs de précipitation n'est plus possible. D'autre part, le pH doit être supérieur au pH isoélectrique des protéines étudiées si on veut voir celles-ci migrer à l'anode. Pour ces raisons, la plupart des auteurs travaillent à pH 8,6.

En ce qui concerne la nature du tampon, nous signalerons que l'utilisation d'un tampon Veronal - Borate donne moins de précipitations non spécifiques qu'avec un tampon Veronal simple. Cette modification facilite la lecture.

Par ailleurs, si l'on est amené à tester des plasmas ou des sérums imparfaitement récoltés, il est nécessaire d'ajouter au tampon utilisé, de l'E D T A afin d'éviter des précipitations de fibrinogène rendant la lecture impossible. L'E D T A sera utilisé à la concentration de 2,92 g/l et le pH sera ajusté à 8,6 avec de la soude 10 N.

3°) Taille et écartement des puits.

La taille des puits avec l'épaisseur du gel conditionne la quantité de sérum utilisé. L'objectif principal étant d'obtenir une sensibilité maxima, nous avons utilisé des puits de grande dimension (5 mm de diamètre). Quant à l'écartement, toujours pour augmenter la sensibilité, nous l'avons limité à 3 mm bord à bord.

Cependant, si l'on recherche surtout à séparer les arcs e_1 anti e_1 et e_2 anti e_2 , il est utile d'utiliser des puits de 3 mm de diamètre et distants de 4 mm. Dans ce cas, il y a une perte de sensibilité non négligeable.

4°) Voltage - Intensité - Durée de migration.

Précisons tout d'abord que le voltage qui intervient est le voltage effectif aux extrémités de la plaque et non pas le voltage à la sortie du générateur. La différence entre les deux est fonction du circuit électrique entre le générateur et la plaque, à savoir conducteur en cuivre, fiches, électrodes, tampon des bacs, ponts. Aussi le voltage devra être mesuré à l'aide d'électrodes externes aux bords de la plaque.

D'autre part, le voltage E et l'intensité I sont liés directement par la résistance R de la plaque qui est constante, selon la relation $E = RI$.

La vitesse de migration de chaque protéine V est fonction de sa mobilité U et de l'intensité du champ électrique H , ce qui se formule par :

$$V = U H.$$

Le champ électrique est le rapport du voltage appliqué aux bornes de la plaque E par la longueur de cette plaque en centimètres L

$$\text{Donc :} \quad V = U \frac{E}{L}$$

La vitesse de migration ainsi définie, il ne reste qu'à fixer la durée de migration (3ème paramètre à intervenir).

Expérimentalement, nous avons déterminé les paramètres donnant les meilleurs résultats : intensité de 13 mA sous un voltage de 110 Volts (5,5 Volts/cm) avec une durée de migration de 45 minutes.

Une différence importante est apparue d'emblée entre Ag HBs et Ag e. Alors qu'après une heure de migration des arcs HBs anti HBs étaient visibles, pour l'Ag-e, les arcs n'apparaissaient qu'après une nuit d'incubation à 28°-30° et de façon assez faible.

Ainsi le système Ag-e / anti-e semblait beaucoup plus faible et difficilement détectable que l'Ag HBs.

Lorsque, ayant observé souvent plusieurs arcs de précipitation, l'hétérogénéité du système e s'est imposée, nous avons cherché à mieux séparer ces arcs qui étaient accolés et dont l'un était contre le puit Ac.

L'utilisation d'un mélange Indubiose Agar Noble ayant échoué, nous avons fait migrer les réactifs en 2 temps. Au temps 0, l'Ac seul est réparti dans les puits et va migrer, puis l'Ag a été repartit 10, 15, 20 et 30 minutes plus tard. La migration a été arrêtée après 45 minutes et les résultats comparés après incubation à 28°C. Il s'est avéré que la séparation optimale est obtenu pour une durée de migration de l'antigène de 30 minutes (Ag réparti 15 minutes après le début de la migration).

5°) Lecture - Coloration

La lecture peut être effectuée après une nuit de migration et doit être répétée après quelques jours. Elle nécessite un éclairage latéral et un fond noir. Les arcs étant souvent peu prononcés, elle demande plus d'attention que celle de plaques d'E I D pour la recherche de l'Ag HBs. Chaque plaque doit comporter plusieurs témoins forts et faibles afin de pouvoir se référer à la forme et à la position de ces arcs de référence.

Il est possible de colorer les plaques avant lecture. Pour cela, après incubation de deux jours, les plaques seront lavées en sérum physiologique une nuit, afin d'éliminer les protéines libres au sein du milieu gélifié. Après quelques rincages dans l'eau distillée, elles seront mises à sécher en les recouvrant d'un papier filtre jusqu'à obtention d'un film de gélose translucide.

On pourra alors procéder à la coloration elle même en utilisant le Bleu de Coomassie ou le Noir Amide comme pour l'Ag HBs.

C'est le Noir Amide que nous avons utilisé.

Solution Colorante :

Noir Amide 0,125 % à dissoudre dans
éthanol 7 volumes
eau distillée 3 volumes
Filtrer 2 fois sur filtres plissés.

Solution décolorante

Acide acétique : 1 volume
Méthanol 9 volumes.

Technique :

Immerger les plaques dans la solution colorante 8 à 10 minutes.
Puis décolorer dans des bains successifs de solution décolorante jusqu'à transparisation de la gélose.

Comme pour l'Ag HBs, nous n'avons pas noté un gain de sensibilité notoire par coloration. Aussi excepté la possibilité de conserver les plaques indéfiniment, la coloration longue et grande consommatrice de solvants organiques, offre peu d'avantages sur une lecture directe soigneuse.

Aussi, ne l'avons nous pas utilisée pour les recherches systématiques d'Ag-e ou d'anti-e.

C - Différents protocoles utilisables pour l'E I D.

1°) Protocole de base

a) Réactifs

- Tampon Véronal pH 8,6 pour bacs à électrophorèse

- . Véronal acide 1,84 g/l
- . Véronal sodique 10,3 g/l

Ajuster le pH à 8,6 après avoir solubilisé les réactifs à chaud.

- Gel d'agarose (pour 100 ml de tampon)

- . Indubiose A 37 1,5 g
- . Dextran T 250 2 g
- . Azide de Sodium 0,2 g.

à dissoudre dans un tampon constitué de :

- 2/3 de Tampon Véronal pH 8,6
- 1/3 d'eau distillée.

b) Technique

1°) Dissoudre l'agarose et le dextran à chaud au bain-marie à 100°. Eviter un chauffage excessif ou prolongé qui provoquerait une hydrolyse de l'agarose.

2°) Couler les plaques à chaud.

On utilisera des plaques de verre de 20 cm x 10 cm dégraissées sur lesquelles on coulera 18 ml de gel. Les plaques sont placées sur un plan à niveau afin d'obtenir un gel d'épaisseur uniforme. Puis les plaques ainsi coulées sont placées en chambre humide à + 4° C. Les plaques peuvent être ainsi conservées 7 jours au maximum.

3°) Lors de la réaction.

A l'aide d'emporte-pièce, réaliser des puits de 5 mm de diamètre distants de 3 mm bord à bord. On peut ainsi réaliser 63 paires de puits permettant de tester 63 sérums. Puis après avoir évidé ces puits, on les remplira de 20 microlitres (μ l) de sérum à tester ou de réactif de référence (e ou anti-e).

La plaque sera ensuite placée dans une cuve à électrophorèse. La liaison entre les bords de la plaque et les bacs est réalisée par du papier filtre WATHMAN N° 1. Les bacs de la cuve seront reliés aux bornes du générateur en gardant à l'esprit que l'Ag migre à l'anode et l'anticorps migre à la cathode. La tension aux bornes du générateur est réglée de manière à avoir une intensité de courant de 13 milli-ampères, ce qui correspond environ à 110 Volts. La durée de migration est fixée à 45 minutes.

La plaque est ensuite placée en chambre humide à 28° C. Une première lecture sera effectuée après 12 à 24 h puis la plaque sera relue après 2 à 3 jours.

Cette technique est celle que nous avons utilisé pour la majorité de nos recherches. Puis nous avons opéré quelques modifications surtout dans le but de mieux séparer les différents arcs éventuellement présents afin de mieux différencier les antigènes e_1 et e_2 ainsi que leurs anticorps respectifs.

2°) Modification de la durée de migration.

Dans un 1er temps on fait migrer l'anticorps seul pendant 15', puis après avoir réparti l'Ag, on fait migrer simultanément l'Ag et l'Ac pendant 30 minutes.

3°) Utilisation d'un tampon borate

Ici le tampon Véronal pH 8,6 est remplacé par un tampon Véronal Borate :

Véronal Sodique	14,5 g/l
Acide Borique	3,1 g/l
Phosphate disodique	2,68 g/l
(7 H ₂ O)	

Avec ce tampon utilisé tel quel pour dissoudre l'Agarose, on utilise un voltage de 65 volts pour obtenir une intensité de courant de 11 à 12 milli-ampères.

III - RESULTATS

=====

1°) Comparaison ID et CEP pour la détection de l'Ag-e et de l'anti-e

657 sérums ont été testés en parallèle en ID et CEP pour la détection de l'Ag-e et de l'anti-e. Il faut remarquer d'emblée que ni l'Ag-e ni l'anti-e n'ont pu être mis en évidence dans un sérum ne contenant pas l'Ag HBs.

Tous les sérums positifs en ID pour l'Ag-e ou l'anti-e l'ont été également en E I D ; ce qui suggère la rareté apparente d'effet de zone par cette technique dans ce système.

En effet, un seul sérum ayant un titre au 1/32ème a donné un effet de zone en E I D. Tous les autres sérums ayant été titrés avaient des titres inférieurs ou égaux au 1/16e.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau suivant. On remarque que le gain de positifs supplémentaires par E I D est sensiblement le même pour la recherche de l'Ag-e (11,8 %) que pour l'Ac anti-e (12,2 %) ce qui fait un total de 24 %. Ce gain de positifs est du même ordre que celui apporté par l'E I D pour la détection de l'Ag HBs.

DETECTION DE L'Ag-e ET DE L'Ac ANTI-e COMPARAISON DES RESULTATS EN ID ET CEP CHEZ LES SUJETS PORTEURS D'Ag HBs.

TECHNIQUE DE DETECTION	NOMBRE DE PORTEURS d'Ag HBs TESTES	NOMBRE DE CAS		
		Ag-e positifs %	Ac anti-e positifs %	Ag-e et Ac anti-e négatifs %
ID	434	77 (17,7)	53 (12,2)	304 (70)
CEP	434	128 (29,5)	106 (24,4)	200 (46,1)
CAS UNIQUEMENT DETECTES EN C E P		51 (11,8)	54 (12,2)	
		<u>TOTAL</u> 105 (24)		

2°) Fréquence de l'Ag-e et de l'anti-e en fonction des différentes pathologies associées au virus HB.

Pour chacune des diverses formes d'hépatites aiguës chroniques et fulminantes ainsi que pour les péri-artérites noueuses, nous avons sélectionné un certain nombre de sérums Ag HBs positifs et négatifs.

Nous disposions pour réaliser cette sélection d'un fichier des malades dont nous avons reçu des sérums avec les résultats successifs des différentes recherches d'Ag HBs ainsi que des renseignements cliniques.

Il nous a paru intéressant de séparer les hépatites aiguës avec Ag HBs en fonction de leur évolution vers la guérison en moins de 3 mois ou le passage à la chronicité. Ceci nous a permis de vérifier la valeur pronostique de la présence de l'Ag-e puisque 7 des 8 cas observés possédaient l'antigène e dès la phase aiguë de la maladie.

La fréquence de l'Ag-e (6,4 %) dans les hépatites aiguës HBs positives ayant guéri, contraste nettement avec celle des hépatites chroniques (58 %) ; la fréquence la plus élevée étant retrouvée dans les P A N Ag HBs positives avec 85 %. En ce qui concerne les hépatites fulminantes, on vérifie qu'on doit se garder d'accorder à la présence de l'anti-e une signification de bénignité ou d'évolution favorable. Ces restrictions vis à vis de l'interprétation de la présence de l'Ac anti-e avaient déjà été formulées par EL SHEIKH (5).

DETECTION DE L'Ag-e et de l'Ac ANTI-e
EN CONTRE-ELECTROPHORESE
CHEZ LES MALADES ATTEINTS DE DIVERSES FORMES D'HEPATITES
ET/OU DE PERI-ARTERITE NOUEUSE.

Syndrome clinique	Ag HBs en DRI	Nombre de cas	NOMBRE DE CAS		
			Ag-e positifs (%)	Ac anti-e positifs (%)	Ag-e ou Ac anti-e négatifs (%)
Hépatites Chroniques (101)	+	84	49 (58)	6 (7)	29 (34,5)
	-	17	0	0	17 (100)
Hépatite B aiguë avec antigénémie HBs ayant guéri (31)	+	31	2 (6,4)	3 (9,6)	26 (83,8)
	-	31	0	1 (3,2)	30 (96,7)
Hépatite B aiguë avec antigénémie HBs suivie d'évolution chronique (8)	+	8	7 (87,5)	0	1 (12,5)
Hépatite aiguë sans Ag HBs (15)		15	0	0	15 (100)
Hépatite fulminante (43)	+	24	0	3 (12,5)	21 (87,5)
	-	19	0	0	19 (100)
Péri-artérites noueuses (44)	+	20	17 (85)	0	3 (15)
	-	24	0	0	24 (100)

3°) Fréquence de l'Ag-e et de l'Ac anti-e chez les porteurs chroniques
d'Ag HBs : hémodialysés ou donneurs de sang.

Si dans les diverses formes d'hépatites, la fréquence de l'Ag-e a une valeur diagnostic différentielle chez les porteurs chroniques de l'Ag HBs la présence ou l'absence d'Ac anti-e est très significative. Alors que l'Ac anti-e est retrouvé chez 65,7 % des donneurs de sang Ag HBs positifs en E I D, on ne le retrouve que chez 4 % des hémodialysés HBs positifs. Chez 80 donneurs de sang, l'Ag HBs négatif en E I D n'était détecté qu'en hémagglutination passive inverse. Chez ces sujets, la fréquence

de l'Ac anti-e n'est plus que de 28,7 % et l'Ag-e était détecté dans un cas. Ceci laisse supposer qu'il est donc possible de détecter l'Ag-e en E I D dans un sérum où l'Ag HBs n'est décelable que par une technique beaucoup plus sensible que l'E I D.

DETECTION DE L'Ag-e et de l'Ac ANTI-e
EN CONTRE-ELECTROPHORESE
CHEZ DES PORTEURS CHRONIQUES D'Ag HBs HEMODIALYSES OU DONNEURS DE SANG

CATEGORIE ETUDIEE	NOMBRE DE CAS	NOMBRE DE CAS		
		Ag-e positifs %	Ac anti-e positifs %	Ag-e Ac anti-e négatifs %
Hémodialysés porteurs chroniques d'Ag HBs 120 détectables en CEP		74 (62)	5 (4)	41 (34)
Donneurs de sang porteurs chroniques d'Ag HBs détectable en CEP	102	2 (2)	67 (65,7)	33 (32,3)
Donneurs de sang HBs positifs en hémagglutination passive inverse négatifs en CEP	80	1 (1,2)	23 (28,7)	56 (70)

4°) Discussion

a) Intérêt de l'E I D

La plupart des travaux consacrés jusqu'ici à la détection de l'Ag-e et de l'Ac anti-e, ont été effectués en I D (6-14-15-16-17-20-21-22-24-29).

PERRILLO a utilisé l'E I D avec semble-t-il, des problèmes de reproductibilité (25).

En effet, on n'obtient des résultats satisfaisants en E I D que si l'on utilise des conditions opératoires bien précises. D'autre part, MAGNIUS étudiant l'Ag-e en immunoélectrophorèse avait indiqué que l'Ag-e avait une mobilité électrophorétique faible voisine de celle des gamma globulines, ce qui semblait empêcher toute utilisation d'une E I D pour sa détection.

Or, si l'on veut mieux préciser la nature et la signification de l'Ag-e et de l'Ac anti-e, il est indispensable de disposer d'une technique sensible. Quoique le gain de sensibilité apporté par l'E I D soit appréciable (24 %) il est probable que comme pour l'Ag HBs, l'E I D doit être remplacée par une technique plus sensible, hémagglutination directe et/ou inverse ou dosage radioimmunologique.

b) Fréquence et valeur pronostique de l'Ag-e et de l'Ac anti-e

L'Ag-e paraît associé spécifiquement à la présence du virus HB puisqu'il n'a jamais été détecté en E I D en l'absence d'Ag HBs. Nos résultats confirment ceux d'autres auteurs.(17 - 20) (4).

L'Ag-e paraît surtout fréquent (59 à 85 %) chez les malades porteurs chroniques d'Ag HBs : hémodialysés (15 - 17), hépatites chroniques (5-33 (4), , péri-artérites noueuses (33). Dans ces cas, l'Ac est exceptionnel. L'inverse s'observe chez les porteurs chroniques sains d'AgHBs chez qui l'on ne détecte l'Ag-e que dans 2 % des cas alors que l'Ac s'observe dans 29 à 66 % des cas.

Au cours des hépatites B aiguës de cette série, l'Ag-e est rare lorsque l'hépatite guérit dans des délais habituels (6,4%).

Il fut par contre détecté dans 7 cas d'hépatite sur 8 ayant évolué vers la chronicité après un épisode aigu. Cette valeur pronostique de l'Ag-e a été mise en évidence par NIELSEN (20) qui a observé ce type d'évolution dans 11 cas consécutifs d'hépatite B aiguë sur 19 cas avec Ag-e décelable.

En cas de guérison de l'hépatite B, on peut observer comme l'a décrit ELEFTHERIOU (4) l'apparition d'Ac anti-e lors de la négativation de l'Ag HBs. Ce phénomène n'a été observé que dans 4 cas sur 31 (13 %).

La plupart des publications sont en accord sur la corrélation existant entre la détection de l'Ag-e et l'évolution vers l'hépatite chronique ; la détection de l'Ac anti-e et l'état de porteur sain (17 - 7 - 33). Cependant, ce schéma souffre des exceptions puisque dans notre étude, l'Ac anti-e est présent dans 7 % des hépatites chroniques. Dans la littérature ce pourcentage varie de 0 % (17) à 10,5 % (4) et même 23 % (5). Si l'Ag-e paraît refléter le risque évolutif de l'infection à virus HB, il ne traduit pas toujours la sévérité des lésions hépatiques puisqu'il paraît absent de l'hépatite fulminante. D'autre part, NIELSEN (20) avait signalé que les hépatites aiguës Ag-e positives se caractérisaient par des taux de transaminases et de bilirubine moins élevés que dans les cas sans Ag-e.

IV - AUTRES TECHNIQUES DE DETECTION DE L'Ag-e ET DE L'Ac anti-e =====

A - La Rhéophorèse.

C'est une technique d'immunodiffusion modifiée de façon à ce que les sérums placés dans les puits périphériques ne diffusent que de façon centripète vers le puit central et non pas radialement. Cette modification a pour but d'augmenter la sensibilité.

Dans la rhéophorèse, l'hexagone aux angles duquel sont placés les puits, est entouré d'une rigole circulaire dans laquelle on place du tampon. La plaque de gélose est recouverte d'une lame de plastique percée en son centre d'un orifice qui va surplomber le puit central. Cette disposition provoque une évaporation de la partie centrale de la gélose. Cette évaporation centrale est compensée par un afflux à travers la gélose et vers le centre, de tampon situé dans la rigole périphérique. Ainsi le sérum des puits périphériques est entraîné vers le réactif du puit central au lieu de se disperser dans toutes les directions.

Ces plaques peuvent être fournies par les Laboratoires ABBOTT sous le nom de "Aus-Tect". Cette technique a été utilisée pour la détection de l'Ag HBs avec une sensibilité supérieure à l'ID mais n'est plus utilisée actuellement à cet usage.

Lors d'essais que nous avons effectué selon les recommandations prescrites par le fabricant, les résultats ont été assez bons pour l'Ag HBs mais nuls pour l'Ag-e. Après concentration 10 fois sur Lyphogel (Laboratoires GELMAN) de sérums Ag-e positifs en E I D, nous n'avons obtenu que des lignes de précipitation médiocre. La technique donnait des résultats inférieurs à l'I D.

Nous avons alors augmenté le diamètre des puits et modifié le gel de ces plaques en le remplaçant par une agarose voisine de celle utilisée en I D :

Indubiose	0,8 %
Dextran T 250	2 %
Azide	0,2 %

dans un tampon 0,01 M TRIS 0,1 M NaCl pH 7,6.

Ces modifications ont légèrement amélioré la sensibilité sans que celle-ci soit satisfaisante.

Enfin PERRILLO (25) utilisant la rhéophorèse pour le système e - anti-e a décrit l'intérêt d'utiliser des puits plus grands mais surtout de laisser diffuser seul le réactif du puit central pendant 3 à 4 heures. Puis on recharge ce puit central et on remplit les puits périphériques. Ainsi, le réactif du puit central peut diffuser radialement alors que sans cela le flux centripète de tampon l'empêche de diffuser.

En utilisant ces modifications, on obtient des résultats supérieurs à l'I D. Sur 20 sérums Ag-e positifs en E I D, 12 se sont révélés positifs en Rhéophorèse et 8 en immunodiffusion. La spécificité de ces 30 sérums avait été au préalable vérifiée en I D après concentration 10 fois sur Lyphogel.

Pour conclure cette technique très simple sous sa forme initiale, devient laborieuse sous sa forme améliorée. Sa sensibilité reste inférieure à celle de l'E I D et elle ne permet de tester que 4 sérums par plaque. Elle nous paraît surtout intéressante pour vérifier la spécificité d'un réactif ou d'un sérum concentré par rapport à un réactif de référence.

B - Immunofluorescence.

L'immunofluorescence directe sur coupes réalisées à partir de ponction biopsies hépatiques a été utilisée pour mettre en évidence la localisation de l'Ag HBs dans le cytoplasme et sur les membranes des hépatocytes. Plus récemment au moyen d'un conjugué anti-e fluorescent, l'Ag-e a pu également être localisé dans le cytoplasme des hépatocytes de porteurs chroniques (34).

Notre but était de pouvoir mettre en évidence dans le sérum l'Ag-e ou l'Ac anti-e au moyen d'une immunofluorescence (I F) directe ou indirecte. Nous avons pour cela essayé d'adapter une technique originale décrite par DEEDLER et PLOEM (2). Cette technique au lieu d'avoir recours comme substrat à une coupe d'organe contenant un antigène, utilise un antigène couplé sur un support synthétique (en l'occurrence de petites billes de Sépharose 4 B). Cette technique a été baptisée par ses auteurs Defined Antigen Substrate Spheres System (D A S S System) et a été utilisée avec succès, pour la recherche des anticorps contre le parasite *Schistosoma Mansoni*.

Nous avons donc préparé une fraction γ globuline purifiée riche en anti-e et l'avons couplé à du Sépharose 4 B activé par du bromure de cyanogène. Après désactivation puis lavage, l'antigène ainsi insolubilisé est utilisé pour la réaction d' I F directe qui a lieu en tubes selon les étapes classiques : incubation du sérum à tester, rinçage, incubation avec un conjugué anti-e fluorescent. Après un nouveau rinçage, on procède à l'examen du culot de billes entre lame et lamelle sous microscope à fluorescence.

Les résultats furent très décevants et aucune des modifications du protocole ne purent les améliorer. Nous avons pensé qu'il fallait incriminer le fait d'avoir couplé au Sépharose une fraction γ globuline enrichie et non pas un anti-e purifié. Aussi afin d'expérimenter cette technique dans des conditions optimales, nous avons utilisé alors le système anticorps anti-tétanique toxoïd . Cependant, alors que nous disposions cette fois d'un antigène purifié, les résultats obtenus quoique encourageants ne furent pas satisfaisants. Aussi, pour le système e - anti-e, cette technique a dû être abandonnée d'autant que nous ne disposons pas actuellement d'un réactif Ag-e purifié.

C - Immunoélectrophorèse.

La 1^{ère} immunoélectrophorèse de l'Ag-e a été réalisée par MAGNIUS (16) qui vérifia ainsi l'absence d'identité immunologique entre l'Ag-e et l'Ag HBs. La localisation de l'arc de précipitation e-anti-e était nettement cathodique par rapport à l'arc HBs - anti HBs et ce quelque soit le pH compris entre 4,5 et 9,5.

Nous avons tenté de préciser la mobilité électrophorétique de l'Ag-e par immunoélectrophorèse en microméthode selon SCHEIDEGGER (27). Le matériel et les réactifs MILLIPORE ont été utilisés. Les anti-sérums ont été préparés à partir de sérums humains riches en anti-e selon le protocole décrit pour l'E I D.

Il est apparu d'emblée que le choix de l'antisérum était très important car seuls certains anti-sérums permettaient de révéler un arc d'Ag-e. Sur 9 anti-sérums testés, seuls 3 ont permis d'obtenir des arcs.

Les arcs de précipitation obtenus portaient du point de dépôt et s'épalaient sur toute la zone des β globulines. D'autres auteurs ont obtenu des résultats analogues (23).

Cependant, une fois encore, se pose un problème de sensibilité car l'Ag-e n'a pu être mis en évidence par cette technique que dans des réactifs concentrés et quelques rares sérums ayant un titre élevé (16 en E I D). D'ailleurs, les arcs de précipitations observés ont toujours été faibles.

V - ETUDE DES SPECIFICITES e_1 et e_2

=====

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'Ag-e est rapidement apparu constitué de plusieurs types de protéines distinctes sérologiquement et physiquement. MAGNIUS sur certaines plaques d'I D notait jusqu'à trois systèmes de précipitation distincts. D'autre part, Le BOUVIER a entrepris l'étude de 2 de ces constituants (37).

Au niveau de la terminologie les auteurs ne sont pas en accord. MAGNIUS préconise l'usage de l'alphabet grec pour ainsi mieux différencier ces constituants du système e, des déterminants antigéniques de l'Ag HBs pour lesquels on a utilisé l'alphabet latin (a d g w r q t etc...). Ainsi donc, MAGNIUS nomme ces deux antigènes epsilon et zeta, alors que Le BOUVIER les nomme e_1 et e_2 (37). En l'absence de toute dénomination officielle, nous utiliserons de préférence les termes de e_1 et e_2 .

e_1 est défini comme l'Ag ayant la vitesse de diffusion la plus grande en I D et e_2 celui qui diffuse le moins vite.

1°) Mobilité électrophorétique

Lorsque nous avons modifié la technique initiale d'E I D en faisant migrer l'Ac anti-e, seul pendant 15 minutes, puis l'Ag et l'Ac pendant 30 minutes, nous nous sommes aperçus que certains sérums donnaient 2 arcs bien séparés. Ce dédoublement de certains arcs avait déjà été observé au préalable avec moins de netteté. Donc e_1 et e_2 ont des vitesses de diffusion différentes mais également des mobilités électrophorétiques différentes. Nous avons dénommé e_1 celui qui migrerait le plus vite. Nous avons pu vérifier au moyen d'échanges de sérums avec Le BOUVIER que l'Ag-1 migrant le plus vite en I D était également le plus rapide en E I D.

Nous avons ensuite testé en immunoélectrophorèse, 4 réactifs Ag-e concentrés qui présentaient deux arcs nets en E I D. Nous avons pu alors constater la présence de 2 arcs de précipitation sensiblement en continuité

l'un de l'autre, le 1er allant du point de dépôt jusqu'en β et le 2ème débordant la zone des β globulines vers les α 2 globulines.

2°) Affinité pour les colorants

L'Ag-e comme l'Ag HBs fixe les colorants des protéines tels le Noir Amide ou le Bleu de Coomassie (15).

Nous avons recherché l'affinité de l'Ag-e pour un colorant des lipides : le rouge Ciba en utilisant une technique usuelle pour la coloration de lipidogrammes. Aucun arc e - anti-e n'a fixé ce colorant.

Une technique histologique de coloration à l'orcéine de l'Ag HBs sur coupes de foie (18) s'étant révélée particulièrement intéressante, nous l'avons testé parallèlement vis à vis de l'Ag HBs et de l'Ag-e.

Réactifs :

1. Permanganate de K

Solution de permanganate à 5 %	9,5 ml
Acide sulfurique à 3 %	5 ml
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

2. Acide oxalique à 2 %

3. Orcéine

Orcéine	2 g
Alcool 70°	100 ml
HCl concentré	2 ml

Le pH doit être compris entre 1 et 2.

4. Alcool chlorhydrique :

1 % HCl
70 % alcool
29 % eau distillée

Protocole :

- Mettre les plaques 10' dans le permanganate de K
- Puis les placer 10' dans l'acide oxalique à 2 %
- Laver sous l'eau du robinet
- Immerger les plaques dans la solution d'Orcéine 4 h ou plus à la température du Laboratoire
- Enfin rincer dans l'alcool chlorhydrique jusqu'à transparence suffisante.

Par cette technique, on obtient une jolie coloration des arcs HBs - anti HBs et aucune coloration des arcs e - anti-e. On dispose donc d'une technique sélective entre ces deux Ag qui sont si souvent simultanément présents dans un même produit biologique.

3°) Présence de e_1 et/ou e_2 et des anticorps anti- e_1 et anti- e_2 en fonction de la pathologie.

Nous avons recherché la fréquence avec laquelle on détectait e_1 , e_2 séparément ou simultanément en fonction des différents types de pathologie liés au virus HB.

Parmi les sérums testés dans 40 cas, on a pu mettre en évidence l'Ag e_1 et/ou l'Ag e_2 . Il est difficile de tirer des conclusions à partir d'aussi petites séries. Les résultats ne semblent pas très différents d'une pathologie à l'autre. Par contre, chez les porteurs sains, il faut remarquer que l'anti- e_1 est présent dans les 25 cas de Formose étudiés et sa fréquence est double de celle de l'anti- e_2 , alors que l'anti- e_2 prédomine nettement aux U S A et également en France de façon moindre. Mais sur l'ensemble des porteurs sains testés, les anti- e_1 et les anti- e_2 sont détectés avec sensiblement la même fréquence.

Pour pouvoir interpréter de tels résultats, il faudrait pouvoir connaître la nature exacte de e_1 et e_2 .

FREQUENCE DES Ag- e_1 et/ou e_2
EN FONCTION DES DIFFERENTS TYPES DE PATHOLOGIE

Type de pathologie	Nombre de sérums testés	e_1	e_2	$e_1 + e_2$	e_1 seul	e_2 seul
Hémodialysés	12	7	7	2	5	5
Hépatite chronique active	16	16	9	9	7	0
Hépatite chronique persistante	12	7	5	0	7	5
TOTAL	40	30	21	11	19	10

FREQUENCE DES ANTICORPS ANTI- e_1 et anti- e_2
CHEZ LES PORTEURS SAINS SELON L'ORIGINE GEOGRAPHIQUE

Origine géographique	Nombre de sérums testés	anti- e_1	anti- e_2	anti- e_1 + anti- e_2	anti- e_1 seul	anti- e_2 seul
FRANCE	27	18	20	11	7	9
U S A	13	5	11	3	2	8
FORMOSE	25	25	12	12	13	0
TOTAL	65	48	43	26	22	17

4° / Inactivation par la chaleur

Le BOUVIER ayant observé que des sérums maintenus 10 jours à 37° perdent leur réactivité Ag e, a-t-il entrepris une étude plus précise de la thermolabilité de l'Ag e globalement et de certains de ses composants e_1 et e_2 (37). D'après ces expériences l'antigénicité est totalement détruite par un chauffage de 10 à 15 minutes à 60°.

En utilisant une température d'inactivation de 55° les susceptibilités individuelles de e_1 et e_2 sont assez différentes.

L'Ag e_2 devient indétectable après 20 à 30 minutes de chauffage à 55° C alors que l'Ag e_1 nécessite 2 à 3 h. de chauffage avant de n'être plus mis en évidence.

Nous avons pu vérifier qu'après un chauffage de 15' à 60°, 27 sérums ayant des titres allant de 1 à 8 ne sont plus détectés par E I D. En l'absence de réactif véritablement monospécifique e_1 ou e_2 nous avons testé l'inactivation par la chaleur à 55° de sérums contenant des mélanges en quantité variable de ces 2 Ag.

S'il a été possible de vérifier qu'après 3 h. à 3h.30 aucune antigénicité n'était plus détectable en E I D, il n'a pas été possible d'attribuer de façon satisfaisante à l'un ou l'autre Ag la persistance de certains arcs pour des durées d'incubation inférieures.

Si cette différence d'inactivation à la chaleur se confirme pour l'Ag e_1 et l'Ag e_2 il serait alors possible par ce procédé de préparer de l'Ag e_1 dépourvu d'Ag e_2 antigéniquement actif.

VI - IMMUNOELECTROMICROSCOPIE

=====

1°) Introduction

Il est clair que l'Ag-e est distinct de l'Ag HBs (15 - 16) et cependant de multiples corrélations existent entre ces 2 systèmes Ag - Ac. Ainsi les porteurs d'Ag HBs chez qui on détecte l'Ag-e ou un titre d'Ag HBs supérieur à ceux chez qui on ne détecte pas l'Ag-e ou qui possèdent de l'anti-e. (33). Ceci se confirme dans cette étude puisque les péri-artérites noueuses et les hémodialysés Ag-e positifs dans 59 à 85 % des cas se caractérisent aussi par des titres élevés d'Ag HBs.

L'absence de l'Ag-e au cours des hépatites fulminantes de type B est très instructive car elle permet de réfuter la suggestion faisant de l'Ag-e un Ag hépatocytaire. D'ailleurs, par immunofluorescence, il a été démontré que l'Ag-e n'était pas un constituant normal de l'hépatocyte (34). La non détection de l'Ag-e dans les cas d'hépatites fulminantes va plutôt de pair avec le titre remarquablement bas d'Ag HBs qu'on observe dans ce syndrome (35).

La corrélation observée entre la détection de l'Ag-e et la fréquence des particules de DANE dans le sérum ou la présence d'Ag HBc dans les noyaux des hépatocytes (33) avait fait postuler que l'Ag-e pouvait être très voisin sinon identique à l'Ag HBc. En fait, la fréquence de l'Ag-e libre circulant chez des sujets chez qui l'on observe également des titres élevés d'Ac anti-HBc dans le sérum va contre cette hypothèse. D'ailleurs, les études réalisées en Immunofluorescence précisent que l'Ag-e se trouve dans le cytoplasme des hépatocytes infectés par le virus HB et non pas dans le noyau comme c'est le cas pour l'Ag HBc (34).

Donc, l'Ag-e distinct des Ag HBs et HBc, serait bien un 3ème Ag associé au virus HB., dont la localisation reste à démontrer. Cette localisation ne peut être précisée que par microscopie électronique.

2°) Résultats antérieurs

Lors d'une étude faite conjointement par le Laboratoire d'Hygiène (Lyon) et le New York Blood Center (19), il avait été avancé que l'Ag-e serait exprimé à la surface des particules virales complètes de 42 nm ainsi que sur les bâtonnets, mais serait absent des petites sphères de 20 nm (ce sont elles qui représentent la masse de l'Ag HBs).

3°) Matériel et techniques utilisés.

Le but de cette étude a été de montrer que un sérum anti-e se fixait spécifiquement sur les particules de Dane et les bâtonnets pour les aggréger sous formes d'immuns complexes d'aspect caractéristique. Il fallait donc disposer de préparations suffisamment riches en diverses formes de particules virales et de différents anti-sérums anti HBs et anti-e.

Les anti-sérums utilisés furent préparés et testés par les techniques précédemment décrites. Les préparations enrichies en particules virales furent préparées par ultracentrifugation zonale à partir d'un matériel déjà enrichi par précipitation au P E G 6000. L'ultracentrifugeuse utilisée était une BECKMAN L 4 avec un Rotor SW 50. Les centrifugations furent réalisées en tampon PBS 0,01 M pH 7,4 , le saccharose étant déconseillé en raison de la coloration négative.

Après 3 heures de centrifugation à 25000 tours/minute, le surnageant est éliminé et le culot est repris par 50 µl de P B S.

L'étape suivante va consister à incuber ce culot avec l'antisérum désiré. Il est commode d'utiliser des plaques de micro titration (COOKE Microtiter).

Après incubation de ces plaques 2 h à 37° on peut procéder à la réalisation des grilles. Cependant afin d'enrichir la préparation en immunocomplexes, on utilisera la technique décrite par KELEN (12).

Cette technique nécessite de préparer 24 h à l'avance, des lames porte-objet pour microscope recouvertes de 5 ml de gélose (Ionagar N° 2 à 0,8 %). On dépose à la surface de cette gélose 1 goutte de 10 µl du mélange culot-antisérum puis on place sur cette goutte, la grille préalablement préparée. On laisse ainsi flotter la grille jusqu'à ce que la goutte ait presque totalement pénétré dans la gélose. On enlève alors la grille qui est prête à être colorée puis examinée. Cette technique permet d'enrichir la préparation en immuns complexes ce qui facilitera grandement l'examen des grilles.

Les grilles utilisées furent des grilles de 200 meshes et les membranes étaient de carbone. Chaque grille a été colorée par la technique de coloration négative au silicotungstate de sodium à 5 %. Le microscope électronique mis à notre disposition était un ELMISKOP 101 SIEMENS.

4°) Résultats - interprétation.

Un total de 50 grilles ont pu être examinées en 7 séances. Sans entrer dans le détail de chaque observation, on peut les classer en :

1. Culots simples permettant à chaque séance d'apprécier la richesse et la répartition en chaque type de particule.
2. Culots incubés avec un sérum anti-HBs utilisé à 2 dilutions différentes.
3. Culots incubés avec différents sérums anti-e à 2 dilutions différentes.

Pour résumer les observations, on peut dire que les culots simples observés se sont révélés très riches en particules de Dane et contenaient de nombreux filaments et sphères de 20 nm. Cette richesse en particules de DANE n'est pas surprenante puisqu'il s'agissait de 2 hémodialysés S A B... et BIL...et dans certains cas d'un sérum d'origine animale provenant d'un chimpanzé CH.31.

Les culots incubés avec un anticorps anti HBs ont montré des images caractéristiques d'immucomplexes. Au sein de ces aggrégats de particules, on a pu reconnaître les 3 types de particules virales bien connues et ce dans des proportions analogues à celles des culots de départ.

Ceci permet de vérifier que l'Ag HBs est bien présent à la surface de toutes les particules présentes dans le sérum. Enfin, et c'était le but de ce travail, il a été possible d'observer qu'un sérum anti-e aggrégait préférentiellement les particules de Dane et quelques bâtonnets à l'exclusion des particules de 20 nm. Il faut cependant souligner la disproportion existant au sein de ces immuns complexes formés par l'anti-e entre le nombre très élevé de particules de Dane et la pauvreté en bâtonnets. Celle-ci pourrait s'expliquer en partie par le fait que les sérums, sources de particules virales n'étaient eux-mêmes pas très riches en bâtonnets.

Lors d'une dernière série d'expériences, afin de préciser la nature des antigènes e_1 et e_2 , nous avons tenté d'étudier l'action d'anticorps spécifiques anti e_1 et anti e_2 sur des culots de particules virales.

L'anticorps anti- e_1 spécifique a été préparé à partir de sérum particulièrement riche en anti- e_1 et absorbé par un réactif ne présentant en E I D qu'un arc e_2 .

Après absorption 2 h à 37° et une nuit à + 4° C, le mélange a été ultracentrifugé à 25 000 tours/minute afin d'éliminer les particules. Un anti- e_2 a été préparé de la même façon. Ces 2 anti-sérums provoquent la formation d'immuns complexes avec une forte majorité de particules de Dane sans que l'on puisse apprécier de différence notable entre l'action de l'un et de l'autre. Il faut se garder d'en déduire que les antigènes e_1 et e_2 sont présents simultanément sur les particules de Dane et sur les bâtonnets. En effet, il est probable que nos antisérums ne soient pas totalement monospécifiques quoiqu'ils ne donnent qu'une ligne de précipitation en E I D contre un sérum $e_1 + e_2$ (vérifié par Le BOUVIER).

L'Ag-e semble donc être exprimé à la surface des particules virales complètes circulantes (particules de Dane) et des bâtonnets comme cela avait été précédemment décrit (19).

C O N C L U S I O N S

Nous avons étudié un nouveau système antigène anticorps décrit par MAGNIUS en 1972 : l'Ag et l'Ac "e" qui paraissent associés au virus de l'Hépatite B (VHB).

L'immunodiffusion (ID) a été utilisée comme technique de référence. Nous avons adapté l'électroimmunodiffusion (EID) à la détection de l'Ag et de l'Ac "e" en précisant les conditions optimales pour ce système Ag/Ac:

- choix et préparation des réactifs et détermination des paramètres de migration électrophorétique les plus favorables.

La méthode d'EID ainsi mise au point a été comparée en sensibilité et spécificité avec l'ID. L'Ag "e" et l'Ac "e" ont été ainsi recherchés parallèlement par ces deux techniques dans le sérum de 544 sujets pouvant être divisés en 3 groupes :

- 1) - 242 malades atteints de diverses hépatites aiguës, fulminantes ou chroniques et périartérite noueuse (PAN) avec ou sans Ag HBs.
- 2) - 120 hémodialysés dont 85 étaient porteurs d'Ag HBs
- 3) - 182 donneurs de sang porteurs chroniques asymptomatiques d'Ag HBs.

Les résultats suivant ont été obtenus :

- L'Ag et l'Ac "e" ne sont détectés qu'en cas d'infection à virus HB.
- l'EID peut être adaptée à la détection de l'Ag et de l'Ac "e" et détecte 24 % de cas supplémentaires.

L'Ag "e" est présent dans 85 % des PAN,
58 % des Hépatites chroniques et chez
59 % des hémodialysés.

L'Ac "e" presque toujours absent des catégories précédentes est retrouvé chez 66 % des porteurs asymptomatiques d'Ag HBs. Dans 90 % des Hépatites B aiguës on ne retrouve ni l'Ag "e" ni l'Ac.

D'autre part l'Ag "e" est apparu comme un système antigénique complexe composé au moins de 2 déterminants antigéniques désignés "e1" et "e2" se différenciant entre autre par leurs propriétés de migration en ID et EID. Nous avons étudié la répartition des Ag "e1" et/ou "e2" dans les différents syndromes pathologiques associés au virus B (hémodialysés, hépatites chroniques et porteurs sains.) Afin de préciser certaines de leurs propriétés physicochimiques nous avons testé leur affinité pour certains colorants et leur inactivation par la chaleur.

Enfin une approche de la localisation de l'Ag "e" sur les différentes particules virales a été amorcée en microscopie électronique et a permis de confirmer les premiers travaux suggérant que l'Ag "e" est situé à la surface des particules de DANE, mais absent des particules de 22 nm qui constituent la forme morphologique prédominante de l'Ag HBs dans le sérum.

L'ensemble des résultats obtenus ainsi que ceux publiés dans la littérature permettent de conclure que l'Ag "e" paraît bien être un troisième Ag viral, spécifique du virus B. Il serait porté par les particules de DANE, forme circulante du virion HB complet.

Cette localisation de l'Ag "e" permettrait d'expliquer que cet Ag puisse être à la fois un marqueur d'infectiosité et d'évolutivité des infections à virus HB comme nous l'avons observé.

Vu, le Directeur de l'U.E.R. des
Sciences Pharmaceutiques,

L. Oddoux
L. ODDOUX

Le Président de la Thèse :

RAK m
Vu et permis d'imprimer
LYON, le 10 juin 1976

Le Président de l'Université
Claude BERNARD

D. GERMAIN *[Signature]*

B I B L I O G R A P H I E

=====

- 1/ - ALMEIDA J.D., RUBENSTEIN D., STOTT E.J.
New antigen-antibody system in Australia antigen positive hepatitis.
Lancet, 1971, 2, 1224-1227

- 2/ - DEEDLER A.M. et PLOEM J.S.
An Immunofluorescence reaction for Schistosoma Mansoni.
Using the defined antigen substrate spheres (DASS) system.
J. Immun. Methods, 1974, 4, 239-251

- 3/ - DEODHAR K.P., TAPP E., SCHEVER P.J.
Orcein staining of hepatitis B antigen in paraffin sections of
liver biopsies.
J. Clin. Path. 1975, 28, 66-70

- 4/ - ELEFThERIOU N., THOMAS M.C., HEATHCOTE J.
Incidence and clinical significance of e antigen and antibody in
acute and chronic liver disease.
Lancet 1975, 2, 1171-1173

- 5/ - EL SHEIKH N., WOLFF I.F., GALBRAITH R.M. et col.
e antigen antibody system as indicator of liver damage in patients
with hepatitis B antigen.
Brit. Med. J. 1975, 4, 252-253

- 6/ - FAY O., EDWARDS V.M., MOSLEY J.W., REDEKER A.G.
The e antigen as an index of chronic hepatitis B virus infection.
Gastroenterology, 1975, 68, 1081

- 7/ - FEINMAN S.V., BERRIS B., SINCLAIR J.C. et col.
e antigen and anti-e in HBs Ag carriers.
Lancet 1975, 2, 1173-1174

- 8/ - MANSSON B.G. et JOHNSON T.
Improved technique for detecting Australia Antigen by immuno electro
osmophoresis.
Vox. Sang. 1971, 21, 531-539

- 9/ - HEATHCOTE J. GATEAU P., SHERLOCK S.
Role of hepatitis B antigen carriers in non parenteral transmission
of hepatitis B virus.
Lancet 1974, 2, 370-371

- 10/ - HEDLUND K.,
Hepatitis B Antigen : removal from protein solutions in a recognizable
form by an insoluble lipophilic matrix of silicic acid.
Life Sci. 1973, 13, 1491-1497

- 11/ - KRUGMAN S., GILES J.P., HAMMOND J.
Infections hepatitis : evidence for two distinctive clinical epidemiological
and immunological types of infection.
J.A.M.A. 1967, 200, 365-373

- 12/ - KELEN A., HATHAWAY A., and Mac LEOD D.
Rapid detection of Australia/SH antigen and antibody by a simple and sensitive technique of immunoelectromicroscopy.
Canad. J. Microbiol. 1971, 17, 993-1000
- 13/ - Le BOUVIER G.L.
The heterogeneity of Australia Antigen.
J. Infect. Dis. 1971, 123, 671-675
- 14/ - MAGNIUS L.O., ESPMARK A.
A new antigen complex co-occurring with Australia Antigen
Acta path. microbiol. scand/ Section B, 1972, 80, 335-337
- 15/ - MAGNIUS L.O., ESPMARK J.A.
New specificities in Australia Antigen positive sera distinct from the Le BOUVIER determinants.
J. Immun: 1972, 109, 1017-1021
- 16/ - MAGNIUS L.O.
Characterization of a new Antigen-Antibody system associated with hepatitis B.
Clin. exp. immun. 1975, 20, 209-216
- 17/ - MAGNIUS L.O., LINDHOLM A., LUNDIN P., IWARSON S.
A new Antigen - antibody system.
Clinical significance in long-term carriers of hepatitis B surface antigen.
J.A.M.A. 1975, 231, 356-359
- 18/ - NAYAK N.C., SACH DEVA R.
Localisation of HBs Ag in conventional paraffin sections of the liver : comparison of immunofluorescence immuno peroxydase and orcein staining methods with regard of their specificity and reliability as antigen markers.
Amer. J. Path. 1975, 81, 479-493
- 19/ - NEURATH A., TREPO C., CHEN M., PRINCE A.
Identification of additional antigenic sites on DANE particles and the tubular forms of hepatitis B surface Antigen.
J. Gen. Virol. 1976, 30, 277-285
- 20/ - NIELSEN J.O., DIETRICHSON O., JUHL E.
Incidence and meaning of the "e" determinant among hepatitis B antigen positive patients with acute and chronic liver diseases.
The Lancet, 1974, 2, 913-915
- 21/ - NORDENFELT E., LINDHOLM T., HENRIKSON M.
The relationship between hepatitis B, e antigen, and liver pathology in patients treated with dialysis.
J. Urol. Nephrol. 1975, 9, 277-282

- 22/ - NORKRANS G., MAGNIUS L.O., IWARSON S.
e Antigen in acute hepatitis B.
Brit. Med. J., 1976, 1, 740-742
- 23/ - OHORI M., SHIRAIISHI H., SHIRACHI R., ISHIDA N.
Chemical characterization of the e antigen in hepatitis B surface antigen (HBs Ag/positive sera)
Personnal communication.
- 24/ - OKADA K., KAMIYAMA I., INOMATA M. et al.
e antigen and anti-e in the serum of asymptomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmission of hepatitis B virus to their infants.
New Engl. J. Med. 1976, 294, 746-749
- 25/ - PERRILLO R.P. et al.
Counter immuno electrophoresis and rheophoresis for the detection of e - antigen/antibody.
H.S.M. 1976, M. 1007, 10
- 26/ - POLSON A., POTGIETER G.M., LARGIER J.F. et al.
The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight.
Biochim. Biophys. Acta 1964, 82, 463-475
- 27/ - SCHEIDEGGER J.J.
Une microméthode de l'immunoélectrophorèse.
Int. Arch. Allerg. 1955, 7, 103-110
- 28/ - SHIRAIISHI M., SUKENO N., SHIRACHI R. et al.
Affinity chromatography of hepatitis B antigen.
Tomoku J., Exp. Med. 1974, 113, 393-394
- 29/ - SHOREY J.
A new hepatitis B virus surface antigen.
J. Infect. Dis. 1976, 133, 1-7
- 30/ - SMITH J.L., MURPHY B.L., AUSLANDER M.O. et al.
Studies of the e antigen in acute and chronic hepatitis.
Gastroenterology sous presse
- 31/ - TILLES J.G., KIM C.Y.
Immunologic and electrophoretic heterogeneity of hepatitis Associated Ag
J. Infect. Dis., 1971, 123, 618-628
- 32/ - TREPO C., TREPO D., ORTIZ J.P., MONIER J.C., SEPETJIAN M.
L'antigène de l'hépatite B (Ag HB ou Ag Australia) intérêt clinique de sa détection par un dosage radioimmunologique en phase solide.
Nouv. Presse Med. 1973, 2, 2339-2340

- 33/ - TREPO C., MAGNIUS L., SCHAEFFER R.A., PRINCE A.M.,
 Detection and clinical significance of e antigen and anti-e antibody
 in hepatitis B surface antigen carriers.
 Gastroenterology, 1975, 69, A-72/872
- 34/ - TREPO C., VITVISKI L., NEURATH R. et al.
 Detection of e antigen by immunofluorescence in the cytoplasm of
 hepatocytes of HBs Ag carriers.
 Lancet 1976, 1, 486
- 35/ - TREPO C., ROBERT D., MOTIN J., TREPO D., SEPETJIAN M. PRINCE A.M.
 Hepatitis B antigen and/or antibodies in fulminant hepatitis ;
 pathogenic and pronostic significance.
 G U T à paraître
- 36/ - TRIPODI D., KOCHESKY R., LYONS S., et DAVIS O.
 Immunochemistry of counter immunoelectrophoresis and the effect of
 electroendosmotic flow on reactivity.
 J. Immun. Methods 1974, 4, 1-10
- 37/ - WILLIAMS A., Le BOUVIER G.L.
 Heterogeneity and thermolability of "e"
 Bibl. Haematol. 1976, 42, 71-74
- 38/ - ZUCKERMAN A.J.
 New tests for hepatitis B virus
 New Engl. J. Med. 1974, 290, 1373-1374

